



REC'D 06 JUN 2003

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 10 908.7

Anmeldetag: 5. März 2002

Anmelder/Inhaber: Professor Dr.rer.nat. Alfred Nordheim, Tübingen/DE;
Dr. Winfried Kammer, Tübingen/DE

Bezeichnung: Vorrichtung zum Aufbringen von flüssigen Medien
und Verfahren dazu

IPC: C 12 M, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
(Im Auftrag)

Waller

A 9161
03/00
EDV-L

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

Anmelder: Prof. Dr. rer. nat. Alfred Nordheim
Dr. Winfried Kammer
Auf der Morgenstelle 15
(Verfügungsgeb.)

72076 Tübingen

Unser Zeichen: P 41 237 DE

05. März 2002
TM/AP/nw

Beschreibung

Vorrichtung zum Aufbringen von flüssigen Medien und Verfahren dazu

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum Aufbringen von flüssigen
10 Medien, insbesondere von Kultur- und/oder Reaktionsmedien sowie ein
Verfahren zur Erzeugung geeigneter Reaktions- und/oder Kultivierungs-
bedingungen.

In der modernen Medizintechnik bzw. Biotechnologie und verwandten
15 Bereichen besteht ein großer Bedarf an Vorrichtungen, mit deren Hilfe
schnell, effizient und nach Möglichkeit mit einem geringen präparativen
Aufwand Substanzen bzw. Substanzkombinationen auf z. B. ihre frucht-
schädigende Eigenschaften, Toxizität (Toxizitätsprofil), Wirksamkeit,
wirksame Konzentration etc., hin untersucht werden können. So wird
20 z. B. bei einer Chemotherapie häufig vorher abgeklärt, ob die Chemosta-
tika die Tumore abtöten können. Dies wird meistens in der Zellkultur ge-
testet. Dabei werden Tumorzellen vom Patienten entnommen und kulti-

viert. Nachdem man eine ausreichende Dichte an Tumorzellen herangezuchtet hat, werden diese dann verschiedenen Chemostatika ausgesetzt. Diejenigen Chemostatika, die in der Zellkultur die besten Ergebnisse erzielen, d. h. die in der geringsten Konzentration die meisten Krebszellen abgetötet haben, werden dann bei der anschließenden Chemotherapie eingesetzt. Es stellt sich aber häufig heraus, daß die *in vitro* erzielten Ergebnisse *in vivo* nicht reproduzierbar sind. Das liegt unter anderem daran, daß die Bedingungen, die in einem Organismus herrschen, kaum in der Zellkultur imitiert werden können.

10

Schwierigkeiten macht auch die Untersuchung von Substanzen auf ihre fruchtschädigenden Eigenschaften. Ein Standardverfahren zur Durchführung solcher Untersuchungen ist die Inkubation von sogenannten embryoiden Körperchen. Embryoide Körperchen entstehen aus embryonalen Stammzellen durch Zell-Aggregation und nachfolgende Zelldifferenzierung. Dabei ist es bis heute nicht gelungen, embryoide Körperchen in einer Form zur Aufzucht zu bringen, bei der sie a) zuverlässig (homogen und automatisierbar) angesät, b) in Volumina von z.B. 40 µl und größer sicher gehandhabt (Robotik) und c) hoch-parallelisiert (automatisiert) analysiert werden können. Somit stehen bisher nur einzeln herangezuchtete embryoide Körperchen für dieses Standardverfahren zur Verfügung. Die Probleme bei der Kultivierung von embryoiden Körperchen liegen unter anderem darin, daß embryonale Stammzellen nur unter bestimmten Bedingungen zu embryoiden Körperchen aggregieren. So spielt z. B. die Konzentration an embryonalen Stammzellen sowie die Versorgung mit geeigneten Nährstoffen eine entscheidende Rolle. Außerdem darf den Zellen keine Möglichkeit gegeben werden, sich an eine Oberfläche anzuheften. Da nur mit hohem finanziellen und präparativen Aufwand einzeln kultivierte embryoide Körperchen für die Untersuchung auf fruchtschädigende Eigenschaften bereitgestellt werden können, und da die Kultivierungs- bzw. die Reaktionsbedingungen bei je-

25

30

dem Test stark variieren, sind die erhaltenen Ergebnisse untereinander nicht verlässlich vergleichbar.

5 Eine Reihe von Firmen hat daher Vorrichtungen bereitgestellt, die eine Lösung für diese Probleme versprechen. So hat z. B. die Firma MWG AG einen sogenannten Affimetrix Arrayer auf den Markt gebracht, der für die automatisierte Herstellung von DNA-Arrays genutzt werden soll. Dieser Affimetrix Arrayer macht sich die sogenannte Pin-and-Ring™-Technologie zunutze. Bei dieser Technologie wird ein sogenannter Pin
10 (Metallhorn) durch eine Flüssigkeitsmembran durchgeführt, die von einem Ring gehalten wird. Dies ähnelt dem „Pustering“ für die Erzeugung von Seifenblasen. Sobald der Pin durch die Flüssigkeitsmembran gestoßen wird, kann dann eine bestimmte Flüssigkeitsmenge mit diesem Pin auf das Array geladen werden. Dieses System kann aber nur zur
15 Übertragung von geringen Flüssigkeitsmengen genutzt werden.

Eine andere Firma, die Berkeley Lab Inc., stellt sogenannte Mikrokristallisationsroboter her. Diese Vorrichtungen kommen insbesondere dann zum Einsatz, wenn die dreidimensionale Struktur von Proteinen mit Hilfe
20 der Kristallographietechnik untersucht werden soll. Um die Funktion eines Proteins zu verstehen, muß dessen Tertiärstruktur aufgeklärt werden. Dazu bedient man sich häufig der Kristallstrukturanalyse. Bei der Kristallstrukturanalyse wird die räumliche Anordnung der Atome in kristallinen Festkörpern mit Hilfe von Röntgen-, Elektronen- oder Neutronenstrahlen, deren Wellenlängen etwa den Atomabständen in Kristallgittern entsprechen, ermittelt. Bei der Ermittlung der Tertiärstruktur von
25 Proteinen wird diese Technik als „protein-x-ray-cristallography“ bezeichnet. Bei der Erzeugung der Kristalle kommt es aber häufig aufgrund unterschiedlicher Umgebungsbedingungen zu keinem gleichmäßigen Aufbau, was als Kristallbaufehler bezeichnet wird und zu falschen Ergebnissen bei der Kristallstrukturanalyse führen kann.
30

Eine weitere Möglichkeit eine Vielzahl von Untersuchungen gleichzeitig durchzuführen, stellen die Mikrotiterplatten dar. Bei den Mikrotiterplatten werden sowohl die (flüssigen) Medien als auch die zu untersuchenden Substanzen direkt auf sogenannte Kavitäten eingefüllt, die letztendlich

5 Reaktionskammern entsprechen, mit einem Boden und seitlichen Begrenzungen. In diesen Kammern findet dann die eigentliche Reaktion/Kultivierung statt.

Weitere Vorrichtungen zum Aufbringen von Medien sind auf dem Markt

10 oder werden in den Forschungsabteilungen bzw. an den Universitäten getestet. Alle weisen aber diverse Nachteile auf. So ist bei dem schon beschriebenen Verfahren zur Untersuchung von Substanzen auf ihre fruchtschädigenden Eigenschaften ein Problem, daß die embryonalen Stammzellen nicht kontrolliert reproduzierbar zu homogenen embry-

15 iden Körperchen aggregieren. Beim Ausplattieren auf z. B. einer Mikrotiterplatte wachsen die Stammzellen auf der gesamten Bodenfläche der Mikrotiterplatte an, wodurch eine Aggregation zu embryoiden Körperchen unterbleibt. Auch die schon beschriebenen Vorrichtungen sind nicht geeignet, geeignetere Kultivierungs-/Reaktionsbedingungen bereit-

20 zustellen. Es wird daher im kleinen Maßstab versucht, durch Auftragen der Flüssigkeit (bei Stammzellen das Kultivierungsmedium) auf z. B. einem Objektträger, welcher im Anschluß gedreht wird, einen sogenannten „hängenden Tropfen“ herzustellen.

25 Solche „hängende Tropfen“ haben einige Vorteile. So werden zum einen die untersuchten Substanzen vollständig von der Flüssigkeit umspült, was eine ausreichende Versorgung mit den benötigten Faktoren, wie z. B. Ionen, Salzen, Differenzierungsfaktoren, Toxinen etc. erlaubt. Zum anderen erlauben „hängende Tropfen“ die Aggregation von embryonalen

30 Stammzellen zu embryoiden Körperchen, da die Zellen im Tropfen nach unten sinken, dort aber keinen Kontakt zu einer festen Oberfläche finden. Mangels anderer Anhaftungsstellen aggregieren die embryonalen

Stammzellen und bilden embryoide Körperchen. Die Oberflächenspannung der Tropfen verhindert das Austreten von embryonalen Stammzellen und embryoiden Körperchen aus den Tropfen. Die Übertragung dieses Prinzips auf größere Maßstäbe zur Erzeugung geeigneter Kultivierungs-/Reaktionsbedingungen für standardisierte Untersuchung(en), wie sie z. B. bei der Evaluierung von Pharmazeutika benötigt werden, scheiterte aber bislang daran, daß für Probleme bezüglich der parallelisierten Handhabung solcher „hängender Tropfen“ keine Lösungen gefunden wurden. So besteht beim Aufbringen mehrerer Tropfen auf eine Oberfläche immer die Gefahr, daß Tropfen ineinanderlaufen. Weiterhin können nur vergleichsweise geringe Volumina aufgebracht werden, da bei Überschreiten eines kritischen Volumens Tropfen bei Bewegung des Trägers unkontrollierbar werden. Schon bei einem Tropfenvolumen von 20 µl können sich Tropfen auf hydrophoben Untergründen bei der Handhabung deutlich bewegen. Um die Herstellung von homogenen hängenden Tropfen zu automatisieren, ist eine einfache und reproduzierbare Möglichkeit ein sogenanntes Toploading. Dabei wird ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen auf eine Unterlage von oben aufgebracht. Wird die Unterlage umgedreht, hängt der Tropfen nach unten. Beim Umdrehen können die Tropfen – abhängig von ihrer Größe – ihren Aufbringungsort verlassen. Es gilt aber die Regel, daß je größer der Tropfen ist, desto unkontrollierbarer ist er in der Handhabung. Andererseits erlauben größere Tropfen eine verlängerte Kultivierdauer ohne Mediumwechsel (das führt z.B. zu länger andauernden Differenzierungsprozessen), eine größere aufbringbare Zellmenge usw.. Außerdem wirken sich Verdunstungsprozesse bei größeren Tropfen nicht so stark aus wie bei kleineren, da das Oberfläche/Volumen-Verhältnis deutlich günstiger ist, als bei kleineren Tropfen. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der ablaufenden Vorgänge im Tropfen deutlich erhöht.

Daraus ergibt sich, daß die Tropfen als eigentliche Reaktionsgefäße

- möglichst groß sein sollten,

- reproduzierbar aufbringbar sein sollten,
- hochparallelisiert/automatisiert erzeugt und eingesetzt werden sollten.

5 Erwünscht ist daher eine Vorrichtung sowie ein Verfahren, mit deren Hilfe flüssige Medien aufgebracht werden können. Im Sinne der obigen Ausführungen sollen zum einen die aufbringbaren Volumina der Medien groß genug sein, um auch längerandauernde komplexe (bio)chemische und/oder biologische Reaktionen ablaufen zu lassen. Zum anderen sollen die Ergebnisse reproduzierbar sein.

10 Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung sowie ein Verfahren bereitzustellen, was universell zur Erzeugung solch geeigneter Bedingungen genutzt werden kann und die beschriebenen Nachteile des Standes der Technik überwinden hilft. Ferner ist es Ziel dieser Erfindung, eine Vorrichtung sowie ein Verfahren bereitzustellen, die mit vergleichsweise geringem präparativen Aufwand die Erzeugung einer Vielzahl von (gleichen) Kultivierungs-/Reaktionsbedingungen ermöglichen.

20 Diese Aufgabe wird gelöst durch die Vorrichtung bzw. das Verfahren mit den Merkmalen der unabhängigen Ansprüche 1 und 20. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 19 bzw. 21 bis 24 dargelegt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

25 Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch Anbringung von scharfkantigen Begrenzungen eine Stabilisierung von flüssigen Medien erfolgt, so daß auch bei größeren Volumina durch Drehen „hängende Tropfen“ entstehen und die Tropfen nicht von der Oberfläche abreißen.

30 Gegenstand der Erfindung ist somit eine Vorrichtung zum Aufbringen von flüssigen Medien, insbesondere von Kultur- und/oder Reaktionsme-

dien, wobei die Vorrichtung mindestens eine aus einem hydrophoben Trägermaterial bestehende, im wesentlichen planare Erhebung aufweist, und diese planare Erhebung mindestens eine, insbesondere zwei parallel zueinander angeordnete scharfkantige Begrenzungen, insbesondere

5 Kanten, hat. Unter planarer Erhebung soll dabei jede Erhebung mit im wesentlichen ebener oberer Begrenzungsfläche verstanden werden. Vorzugsweise ist die Erhebung dabei würfel- oder quaderförmig. Auch pyramidenstumpfförmige oder ähnliche Erhebungen sind möglich. Die Erhebung kann an ihrer oberen Begrenzungsfläche auch eine leicht

10 konvexe oder konkave Ausgestaltung haben. Wesentlich ist, daß die auf die aus einem hydrophoben Trägermaterial bestehende Erhebung auf-gebrachten flüssigen Medien durch die scharfkantige Begrenzung(en)/Abgrenzung(en) der oberen Begrenzungsfläche als Tropfen fixiert werden. Weiterhin ist es auch erfindungsgemäß vorgesehen, das

15 entsprechende Wirkprinzip umzudrehen. Dabei kann ein hydrophiles Trägermaterial genutzt werden, auf dem dann ein hydrophobes flüssiges Medium aufgebracht wird. Dabei erfolgt die Fixierung erneut über die scharfkantigen Begrenzung(en)/Abgrenzung(en) der oberen Begrenzungsfläche.

20

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Abmessung einer planaren Erhebung in Längsrichtung zwischen 4 und 7 mm, vorzugsweise ca. 5 mm. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Abmessung einer planaren Erhebung in Querrichtung zwischen

25 5 und 9 mm, vorzugsweise ca. 7 mm. Auch andere Abmessungen der Erhebung werden erfindungsgemäß beansprucht, sofern die Erhebung mindestens eine scharfkantige Begrenzung zur Stabilisierung des flüssigen Mediums aufweist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die planare Erhebung zwischen 1 und 5 mm, vorzugsweise ca. 2

30 mm hoch. Die Höhe der Erhebung richtet sich dabei insbesondere nach dem verwendeten hydrophoben Trägermaterial sowie dem zweckdienlichen Verfahren zur Produktion geeigneter Vorrichtungen. So richtet sich

die Höhe einer Erhebung z. B. bei Fräsung nach der Frästiefe sowie der Linienbreite, die je nach Ausgestaltung der Vorrichtung variieren kann.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die
- 5 Vorrichtung mindestens zwei, vorzugsweise eine Vielzahl von planaren Erhebungen auf. Dabei kann die Anzahl der planaren Erhebungen in Längsrichtung mindestens 18 und in Querrichtung mindestens 9 betragen. Die Anzahl der Erhebungen ist abhängig von den Gesamtabmessungen der Vorrichtung, dem Verwendungszweck (z. B. Zellkultur) etc..
- 10 Sofern die Vorrichtung mehrere planare Erhebungen aufweist, sind diese in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform voneinander zwischen 1 und 4 mm, vorzugsweise ca. 2 mm, insbesondere 0,5 bis 1,5 mm, entfernt.
- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die scharfkantige Begrenzung recht- bis spitzwinklig. Unter spitzwinklig wird erfindungsgemäß ein Winkel $< 90^\circ$ verstanden.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform besteht die Vorrichtung
- 20 tung mindestens teilweise, vorzugsweise vollständig, aus mindestens einem transparenten Trägermaterial. Als Trägermaterial selbst kommen z. B. Polystyrol und/oder Plexiglas in Frage, die in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beansprucht werden. Aber auch alle anderen hydrophoben Trägermaterialien können für die erfindungsgemäße Vor-
- 25 richtung benutzt werden. Die Verwendung eines transparenten Trägermaterials hat den Vorteil, daß die Auswertung mit Hilfe geeigneter optischer Verfahren, z. B. Mikroskopie, Fluoreszenzmessung etc. direkt auf der Vorrichtung selbst erfolgen kann.
- 30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Vorrichtung zwischen 10 und 30 mm, vorzugsweise unter 23 mm, hoch. In Längsrichtung können die Abmessungen der Vorrichtung zwischen 100 und 150

mm, vorzugsweise ca. 130 mm, und in Querrichtung zwischen 80 und 100 mm, vorzugsweise ca. 90 mm, betragen, was in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beansprucht wird. Die Abmessungen der Vorrichtung richten sich dabei nach dem erwünschten Einsatzort. So wird z. B. die Vorrichtung bei Einsatz in einem Zellinkubator den Abmessungen im Innenraum entsprechend angepaßt werden. Soll die erfindungsgemäße Vorrichtung in z. B. ein Rundgefäß eingefast werden, so entspricht der Durchmesser des Rundgefäßes den maximalen Längs- bzw. Querabmessungen der Vorrichtung.

10

Die Vorrichtung hat in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform mindestens eine, vorzugsweise zwei Haltemöglichkeiten, so daß ein problemloser Transport der Vorrichtung ermöglicht wird. Die Vorrichtung hat in einer weiteren Ausführungsform mindestens eine, vorzugsweise mehrere Standflächen, insbesondere Standfüße. Wird z. B. die erfindungsgemäße Vorrichtung freistehend benutzt, dann kann die Vorrichtung vier Standfüße aufweisen, um einen festen Stand zu haben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind mindestens zwei Vorrichtungen aufeinander stapelbar. Dabei können mindestens zwei Vorrichtungen miteinander lösbar befestigbar sein. So ist es z. B. erfindungsgemäß möglich, mehrere Vorrichtungen durch Rast-, Steck- oder Klemmverschlüsse miteinander zu verbinden. Diese dann miteinander verbundenen und aufeinander gestapelten Vorrichtungen können dann anschließend gemeinsam transportiert und/oder inkubiert – z. B. in der Zellkultur – werden. Alternativ können Einschubvorrichtungen für ein bis mehrere Tropfenträgerplatten für Transport und Inkubation benutzt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist zwischen 10 und 80 µl, vorzugsweise 40 bis 80 µl, flüssiges Medium je Erhebung aufbringbar. Die Vorrichtung kann nach Aufbringen der flüssigen Medien um

mindestens 90°, vorzugsweise ca. 180°, gedreht werden, was in einer weiteren Ausführungsform beansprucht wird. Durch Drehen der Vorrichtung werden dann sogenannte „hängende Tropfen“ erzeugt.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Erzeugung geeigneter Reaktions- und/oder Kultivierungsbedingungen nach Aufbringung von flüssigen Medien beansprucht, in dem eine erfindungsgemäße Vorrichtung benutzt wird. Bei den geeigneten Kultivierungsbedingungen kann es sich um geeignete Bedingungen für Prolifra-

10 tions- und/oder Differenzierungsassays für eukaryotische Zellen handeln. Bei den eukaryotischen Zellen handelt es sich insbesondere um menschliche oder tierische Zellen bzw. um Zellverbände, Gewebe, Organoide oder Organe, was in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beansprucht wird.

15

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den menschlichen oder tierischen Zellen um Stammzellen, insbesondere um embryonale Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind sogenannte totipotente Zellen, d. h. sie können in alle Zelltypen differenzieren. In

20 einer bevorzugten Ausführungsform aggregieren diese embryonalen Stammzellen nach Aufbringung zu embryoiden Körperchen.

Abschließend kann es sich in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bei den geeigneten Reaktionsbedingungen um Kristallisierungs-

25 und/oder Röntgenstrukturanalysebedingungen handeln. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann genutzt werden, um z. B. Kristallisierungskammern in Tropfenform zu erzeugen. Nach Kristallisierung der Proteine kann so z. B. mit Hilfe von Röntgen-, Elektronen- oder Neutronenstrahlen die dreidimensionale Struktur der Proteine festgestellt werden.

30

Weitere Einzelheiten und Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung der Darstellung von bevorzugten Ausführungs-

rungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des Verfahrens in Verbindung mit den Unteransprüchen. Hierbei können die jeweiligen Merkmale für sich alleine oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

5 In den Abbildungen zeigen:

Fig. 1: Auf- und Seitenansicht einer möglichen Ausgestaltung der Vorrichtung.

10 Fig. 2: Aufsicht auf eine Vorrichtung, in (A) unbeladenem bzw. (B) beladenem Zustand.

Fig. 3: Seitenansicht auf eine mit einer Flüssigkeit beladenen Vorrichtung.

15

Fig. 4: Seitenansicht auf eine mit einer Flüssigkeit beladenen Vorrichtung.

Fig. 5: Schrägansicht der Unterseite der Vorrichtung.

20

Fig. 6: Aufsicht auf einzelne beladene Erhebungen.

Fig. 7: Aufsicht auf eine auf der Seite stehende (A) unbeladene, (B-D) beladene Vorrichtung.

25

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung einer möglichen Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung (11). Die Vorrichtung (11) besteht aus einem Trägermaterial (12) und einer Vielzahl an Erhebungen (13), mit im wesentlichen planarer oberer Begrenzungsfläche. Weiterhin werden die scharfkantigen Begrenzungen (14) gezeigt. Die einzelnen (planaren) Erhebungen (13) sind voneinander jeweils 2 mm entfernt. Die

30

Abmessungen einer Erhebung betragen in Längsrichtung 5 mm und in Querrichtung 7,1 mm. Insgesamt sind in Längsrichtung 18 und in Querrichtung 9 Erhebungen dargestellt.

- 5 Fig. 1A zeigt eine Aufsicht und perspektivische Seitenansicht der Vorrichtung. Eine solche Vorrichtung kann z. B. aus einer Polystyrolplatte (ca. 4 mm x 130 mm x 130 mm) oder einem Plexiglasblock hergestellt werden. Dabei werden mittels einer Fräse die dargestellten Erhebungen herausgefräst, wobei Linien von 2 mm Breite und 2 mm Tiefe aus der
- 10 Platte bzw. aus dem Block herausgefräst werden. Je nachdem, welche Abmessungen die Vorrichtung haben soll, kann diese danach bearbeitet werden. So können Ausstülpungen der Polystyrolplatte als Haltegriffe dienen. Auch können z. B. die Ecken der Vorrichtung (11) abgerundet werden, wie in Fig. 1B dargestellt, so daß diese in ein Rundgefäß mit
- 15 entsprechendem Durchmesser eingesetzt werden kann. Ferner können auch Standfüße an der Vorrichtung angebracht werden, z. B. durch Ankleben, damit die Vorrichtung eine bessere Standfestigkeit hat.

- Fig. 2 zeigt eine Aufsicht auf eine erfindungsgemäße Vorrichtung. Diese
- 20 Vorrichtung ist wie bei Fig. 1 beschrieben hergestellt worden. Fig. 2A zeigt dabei eine in Nutzposition platzierte Platte im unbeladenem Zustand. Die Platte steht auf vier Standfüßen und befindet sich noch im unbeladenen Zustand. Fig. 2B zeigt die gleiche Platte, nachdem eine Kulturmediumlösung aufgebracht wurde. Man erkennt deutlich die abge-
- 25 rundeten, klaren Abgrenzungen der tropfenförmig an jeder Erhebung anhaftenden Kulturmediumlösung an den Rändern (Kanten) jeder Erhebung. Die Tropfen hängen in Blickrichtung nach unten.

- Fig. 3 zeigt in Seitenansicht die gleiche Platte wie in Fig. 2, nachdem sie
- 30 mit einer Kulturmediumlösung beladen und in Nutzungsposition gebracht wurde. Zur besseren Illustration der sich nach Invertierung bildenden hängenden Tropfen ist die Vorrichtung auf eine Glasplatte aufgestellt

worden, so daß aufgrund der Spiegelung auch die Unterseite der Vorrichtung abgeleuchtet werden konnte. Fig. 3A zeigt die komplett beladene Vorrichtung, während Fig. 3B und 3C verschiedene Vergrößerungen darstellen.

5

Fig. 4 zeigt erneut eine mit Kulturmedium beladene und in Nutzposition gebrachte Vorrichtung. Auch hierbei steht die Vorrichtung auf vier Standfüßen. Anders als in Fig. 3 ist in Fig. 4 ein nicht spiegelnder Untergrund gewählt worden. Fig. 4A stellt dabei eine Seiten- und Fig. 4B eine schräge Seitenansicht dar.

10

In Fig. 5 ist die Unterseite der Vorrichtung von schräg unten durch einen transparenten Untergrund abgeleuchtet worden. Man erkennt deutlich, wie schon in den Fig. 3 und 4, die herabhängenden Tropfen, die sich an jeder einzelnen (jetzt nach unten ragenden) Erhebung gebildet haben. Jeder einzelne dieser Tropfen wird dabei durch die scharfkantigen Abgrenzungen bzw. Kanten an den Rändern jeder Erhebung stabilisiert.

15

In Fig. 6 ist eine stark vergrößerte Aufnahme einzelner, mit einem Kulturmedium beladenen Erhebungen wiedergegeben. Die Vorrichtung liegt hierbei auf dem Rücken, d. h. die nicht dargestellten Standfüßchen zeigen senkrecht nach oben. Diese Position wird gewählt, um die auf der Vorrichtung liegenden Erhebungen von oben mit der Flüssigkeit zu beladen. Man erkennt in Fig. 6 deutlich die im wesentlichen rechteckige, an den Ecken abgerundete Form der aufgetragenen Tropfen.

20

25

Fig. 7 zeigt eine angelehnte, auf der Seite stehende Vorrichtung. Die Standfüßchen der Platte stehen dabei in etwa horizontal zum Untergrund, während die Platte im wesentlichen vertikal zum Untergrund ausgerichtet ist. In Fig. 7A ist die Vorrichtung im unbeladenen Zustand abgeleuchtet, während die Fig. 7B bis 7D die gleiche Platte im beladenen Zustand in verschiedenen Vergrößerungsstufen zeigt. So erkennt man

30

z. B. deutlich in Fig. 7C die bauchige Ausgestaltung der Tropfen. Die Stabilisierung der Tropfen durch die scharfkantigen Abgrenzungen der einzelnen Erhebungen verhindern ein Abreißen des Tropfens. Diese Stabilisierung ist deutlich in Fig. 7B und 7D erkennbar.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Aufbringen von flüssigen Medien, insbesondere von Kultur- und/oder Reaktionsmedien, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung mindestens eine aus einem hydrophoben Material bestehende Erhebung mit im wesentlichen planarer oberer Begrenzungsfläche aufweist, und diese planare Erhebung an der oberen planaren Begrenzungsfläche mindestens eine, insbesondere zwei parallel zueinander angeordnete scharfkantige Begrenzungen, insbesondere Kanten, hat.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Abmessung einer planaren Erhebung in einer ersten Richtung, vorzugsweise in Längsrichtung zwischen 4 und 7 mm, vorzugsweise ca. 5 mm, beträgt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Abmessung einer planaren Erhebung in einer zweiten Richtung, vorzugsweise in Querrichtung zwischen 5 und 9 mm, vorzugsweise ca. 7 mm, beträgt.
4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die planare Erhebung zwischen 1 und 5 mm, vorzugsweise ca. 2 mm, hoch ist.
5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung mindestens zwei, vorzugsweise eine Vielzahl von planaren Erhebungen aufweist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzahl der planaren Erhebungen in Längsrichtung mindestens 18 und in Querrichtung mindestens 9 beträgt.
7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Abstand zwischen zwei benachbarten planaren Erhebungen zwischen 0,5 und 4 mm, vorzugsweise zwischen 1 und 2 mm, insbesondere ca. 2 mm, beträgt.
8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die scharfkantige Begrenzung spitzwinklig ausgebildet ist.
9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen vorzugsweise rechteckförmigen Grundkörper aufweist, an dem die planaren Erhebungen ausgebildet sind.
10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung mindestens teilweise, vorzugsweise vollständig aus mindestens einem transparentem Material besteht.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Material Polystyrol und/oder Plexiglas ist.
12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Abmessungen der Vorrichtung in einer ersten Richtung, vorzugsweise in Längsrichtung zwischen 100 und 150 mm, vorzugsweise ca. 130 mm, und in einer zweiten Richtung, vorzugsweise in Querrichtung zwischen 80 und 110 mm, vorzugsweise ca. 90 mm, betragen.

13. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung eine Gesamthöhe zwischen 10 und 30 mm, vorzugsweise unter 23 mm, aufweist.
14. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung mindestens einen, vorzugsweise zwei Haltegriffe hat.
15. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung mindestens eine, vorzugsweise mehrere Standflächen, insbesondere Standfüße, hat.
16. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie stapelbar ausgebildet ist.
17. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Vorrichtungen aneinander lösbar befestigbar sind.
18. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß je Erhebung zwischen 10 und 80 µl, vorzugsweise 40 bis 50 µl, flüssiges Medium aufbringbar ist.
19. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung nach Aufbringen der flüssigen Medien um mindestens 90°, vorzugsweise ca. 180°, drehbar ist.
20. Verfahren zur Erzeugung geeigneter Reaktions- und/oder Kultivierungsbedingungen nach Aufbringung von flüssigen Medien, gekennzeichnet durch die Verwendung einer Vorrichtung mit mindestens einem Merkmal eines der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 19.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Kultivierungsbedingungen um Proliferations- und/oder Differenzierungsbedingungen für eukaryotische Zellen, insbesondere menschliche oder tierische Zellen, handelt.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den menschlichen oder tierischen Zellen um Stammzellen, insbesondere um embryonale Stammzellen, handelt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die embryonalen Stammzellen nach Aufbringung auf die Vorrichtung zu embryoiden Körperchen differenzieren.
24. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Reaktionsbedingungen um Kristallisierungs- und/oder Röntgenstrukturanalysebedingungen handelt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum Aufbringen von flüssigen Medien, insbesondere von Kultur- und/oder Reaktionsmedien sowie ein
5 Verfahren zur Erzeugung geeigneter Reaktions- und/oder Kultivierungsbedingungen.

Fig. 1

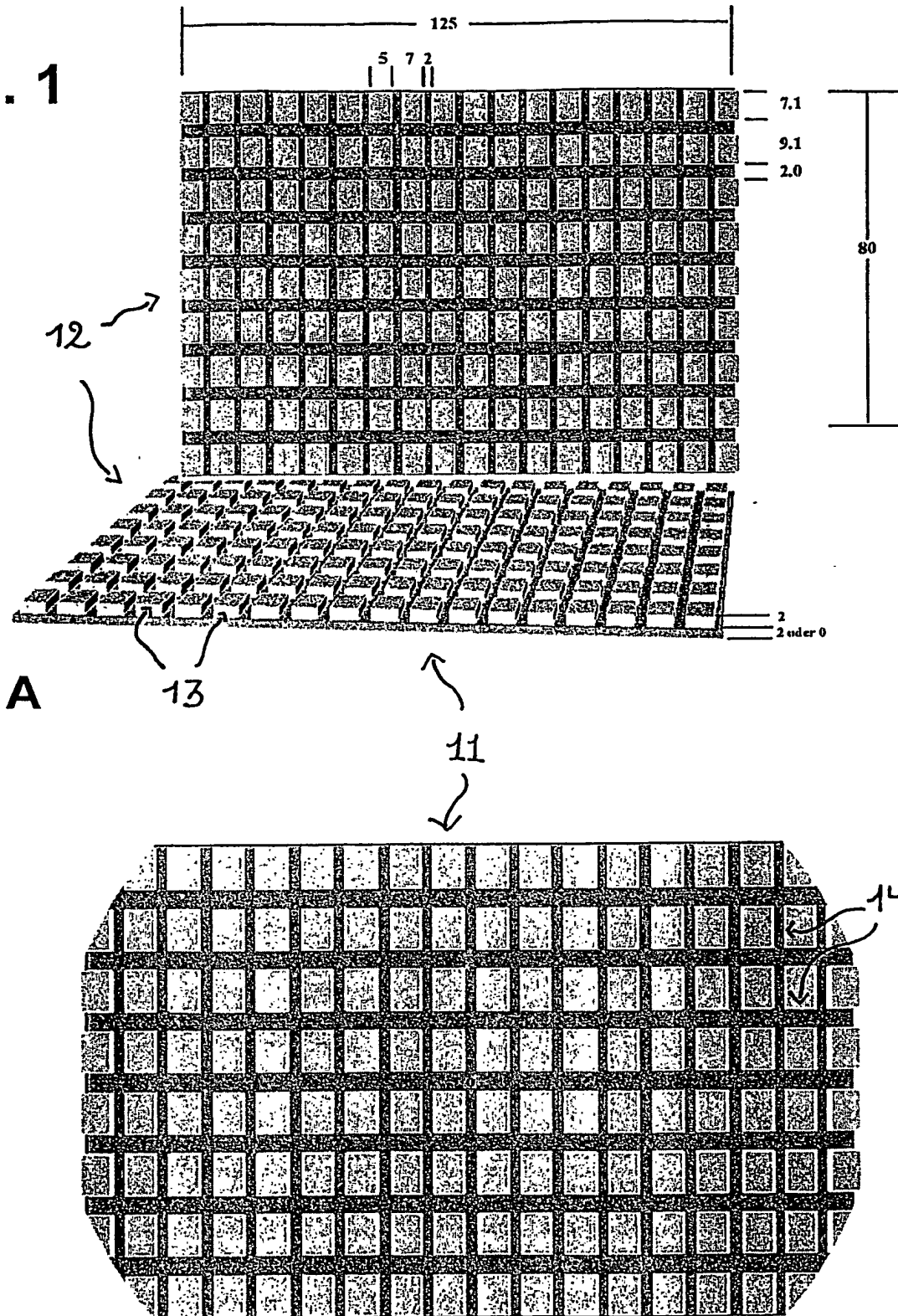


Fig. 2

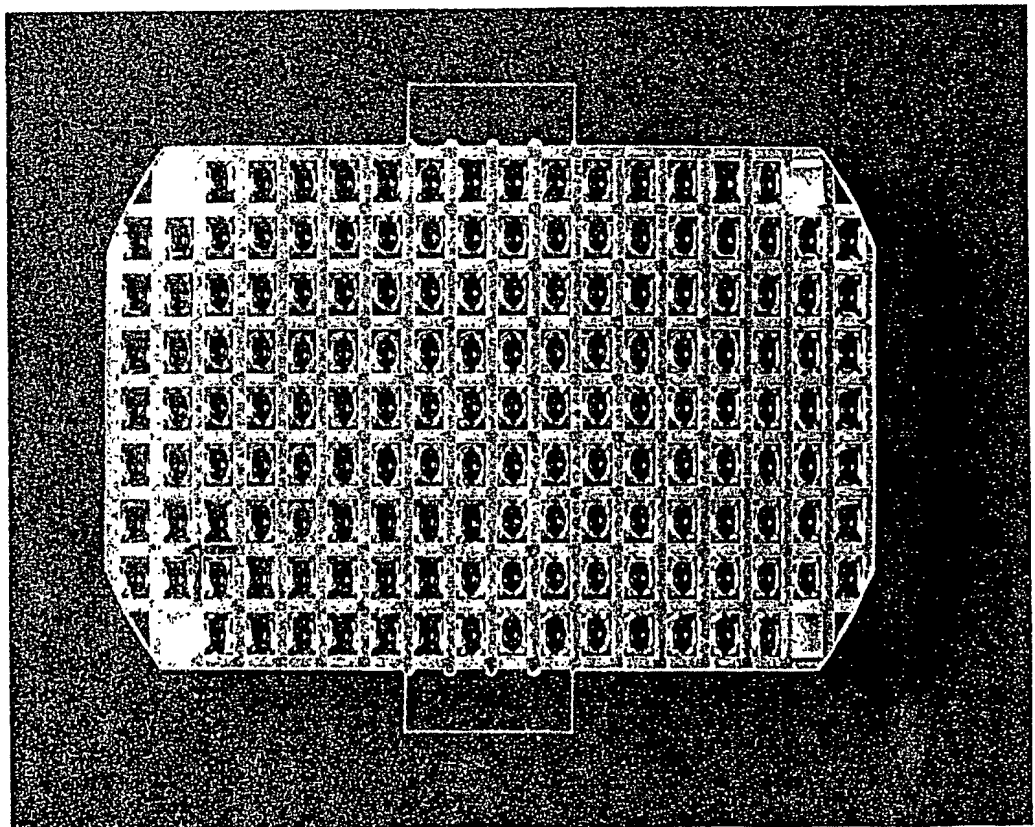
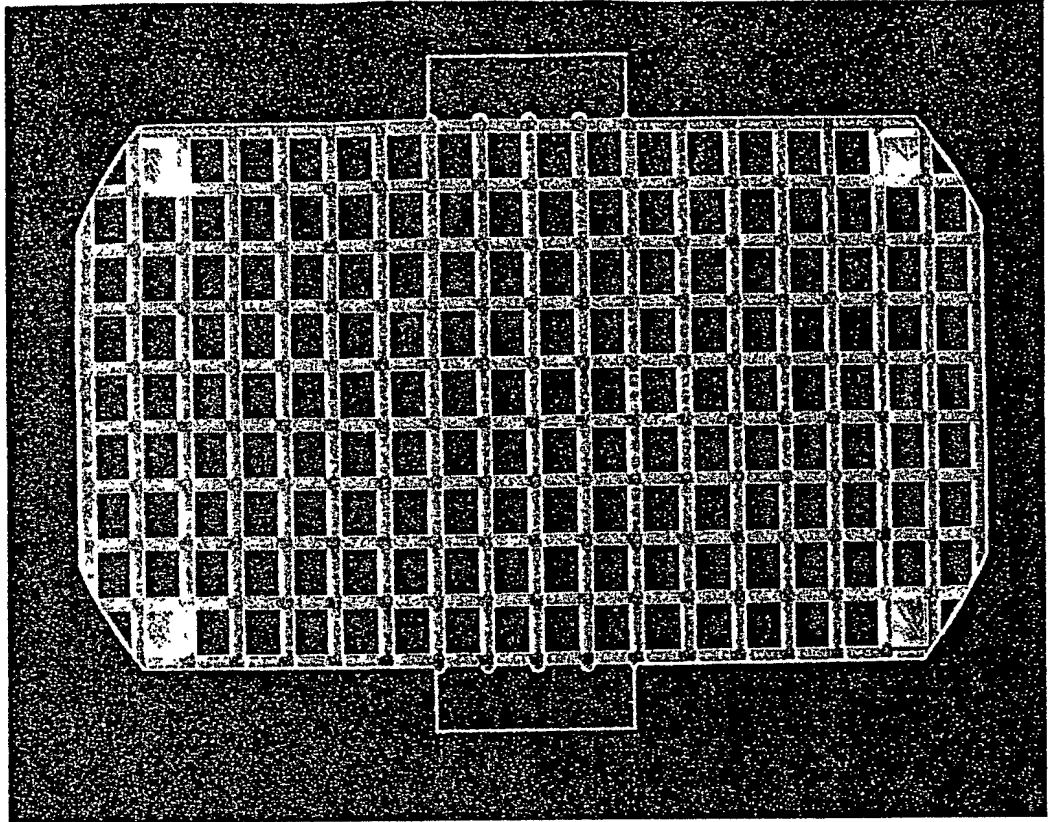
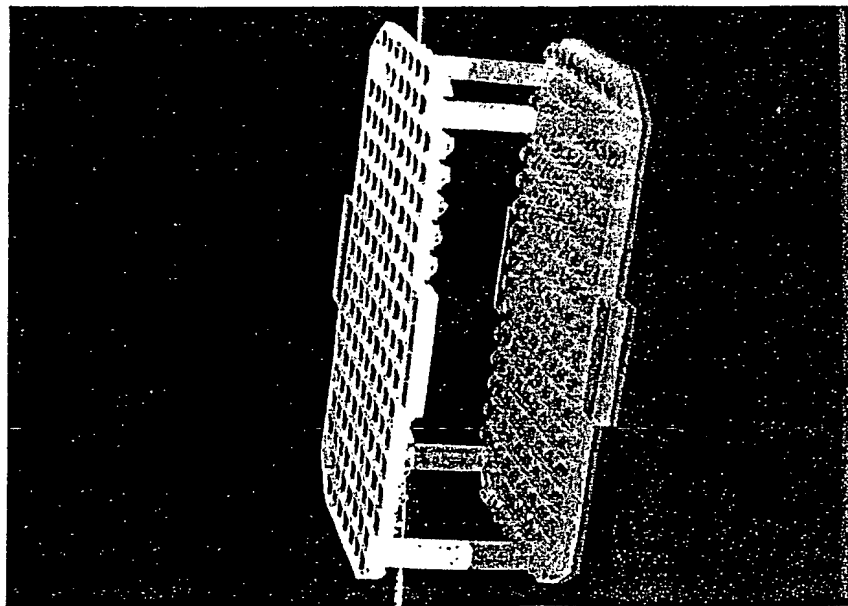
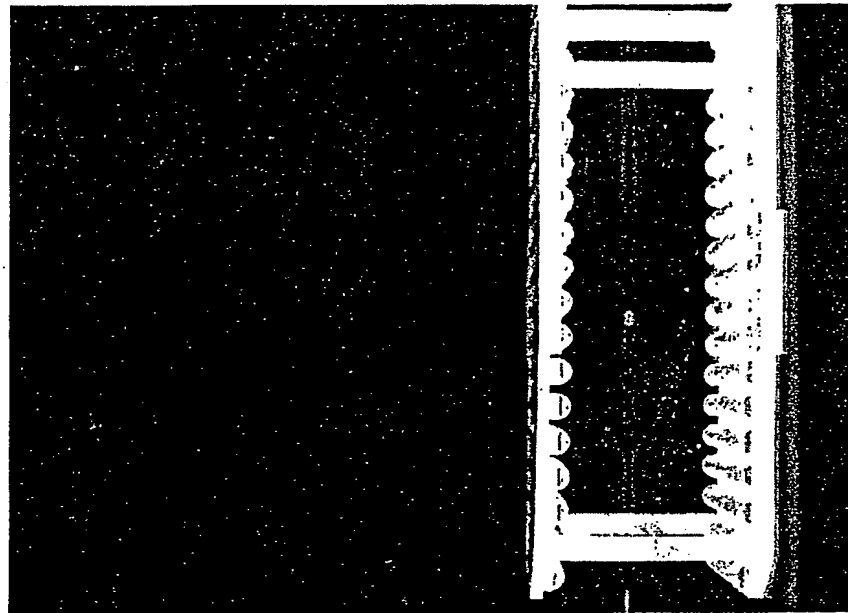


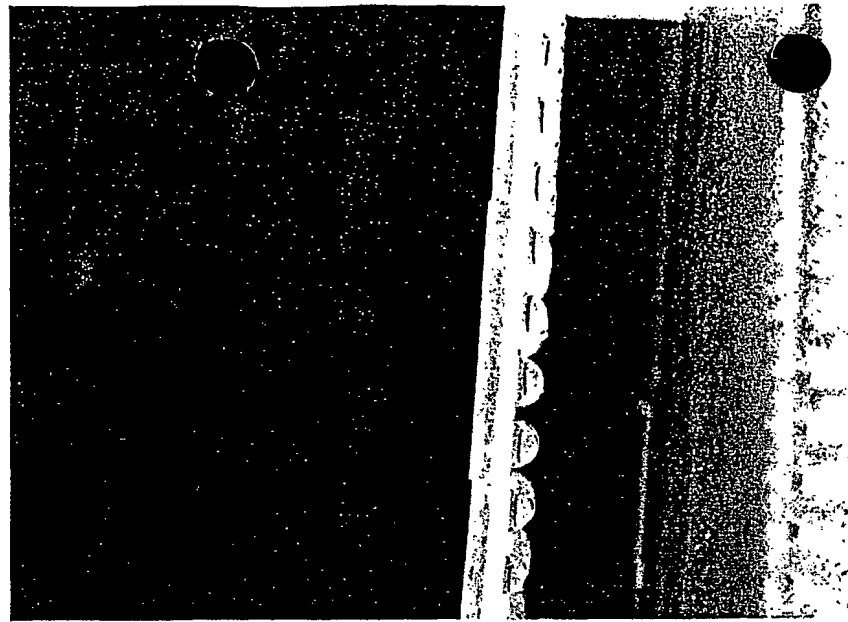
Fig. 3



A

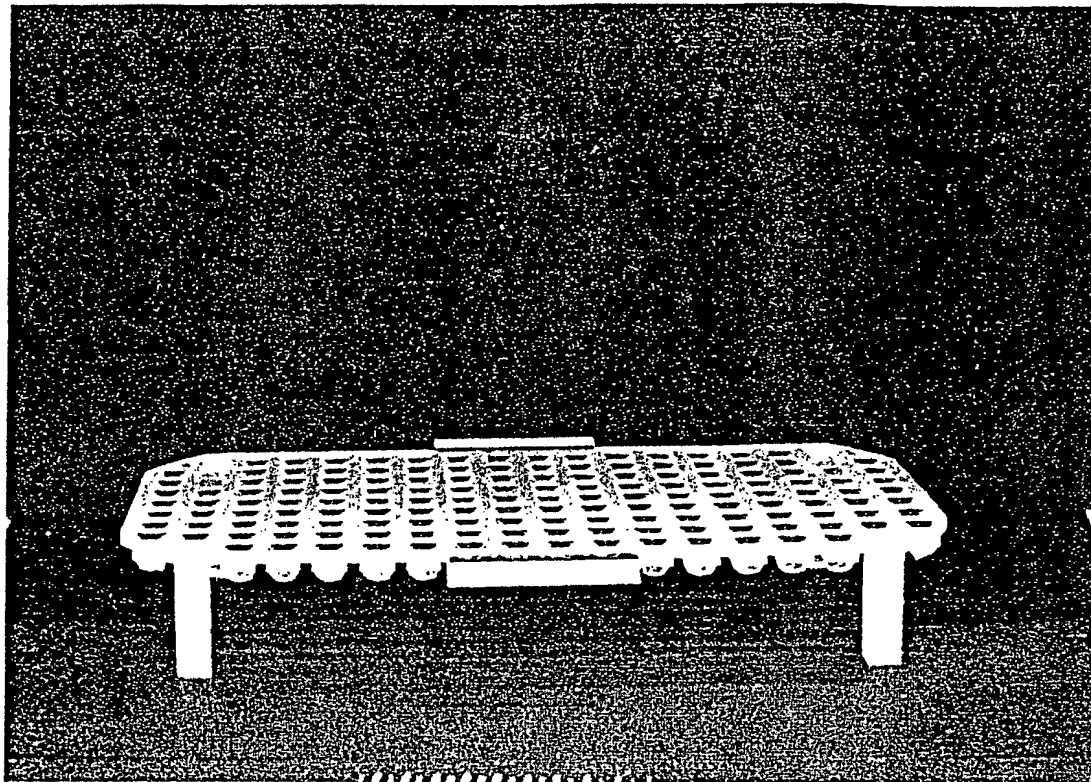


B

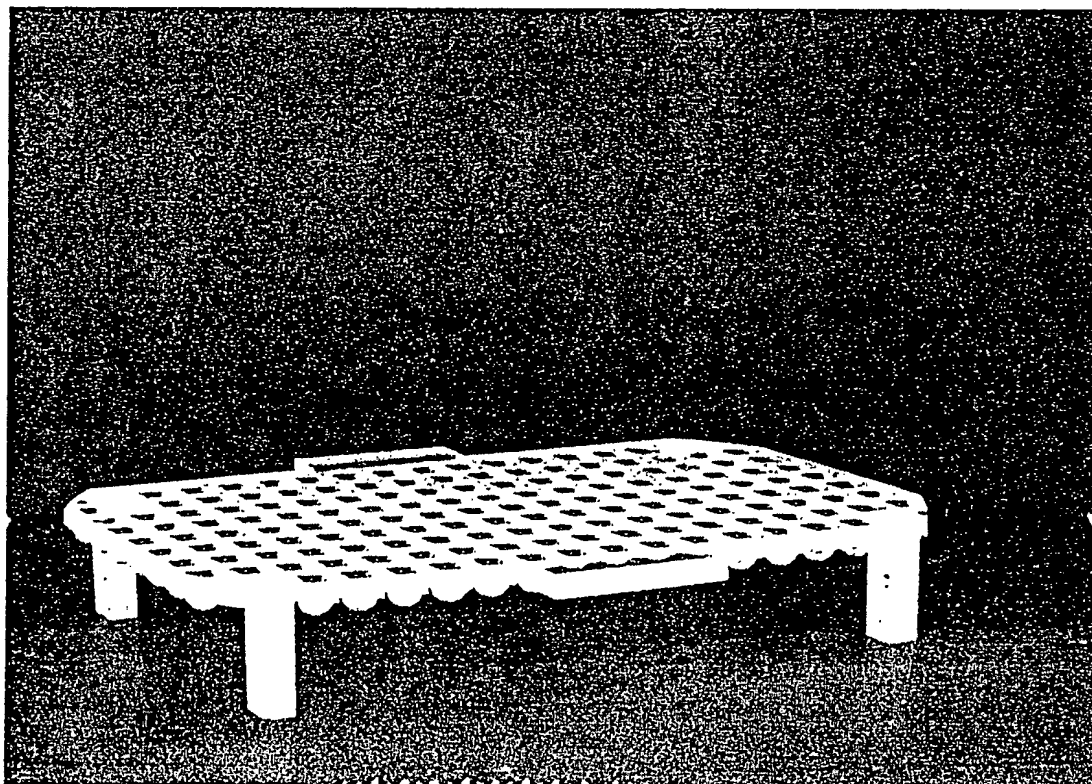


C

Fig. 4

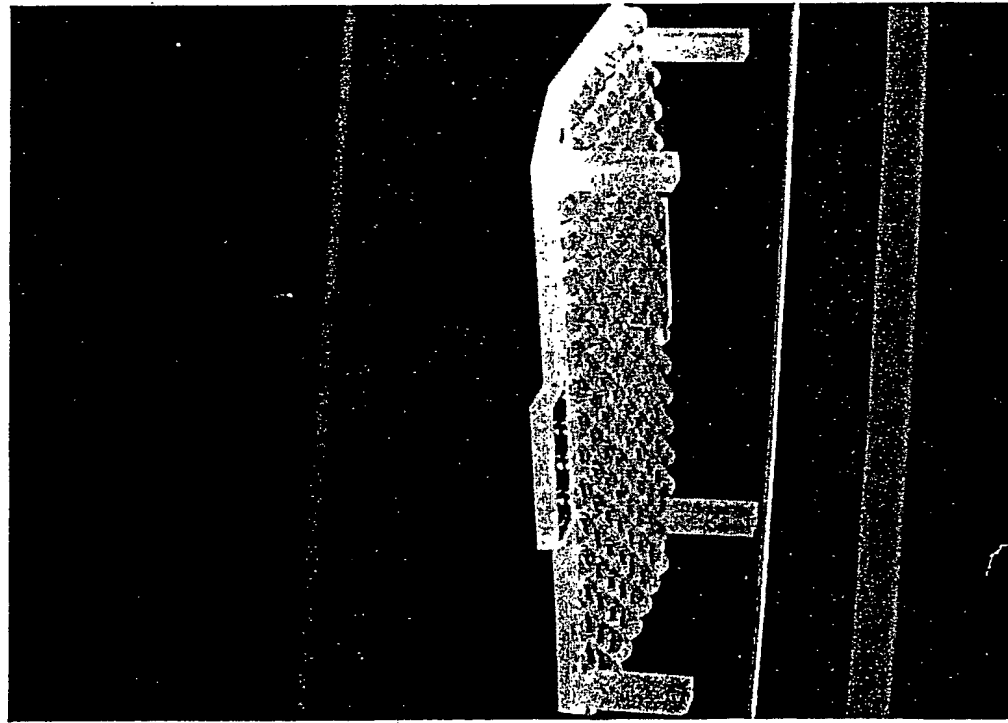


A

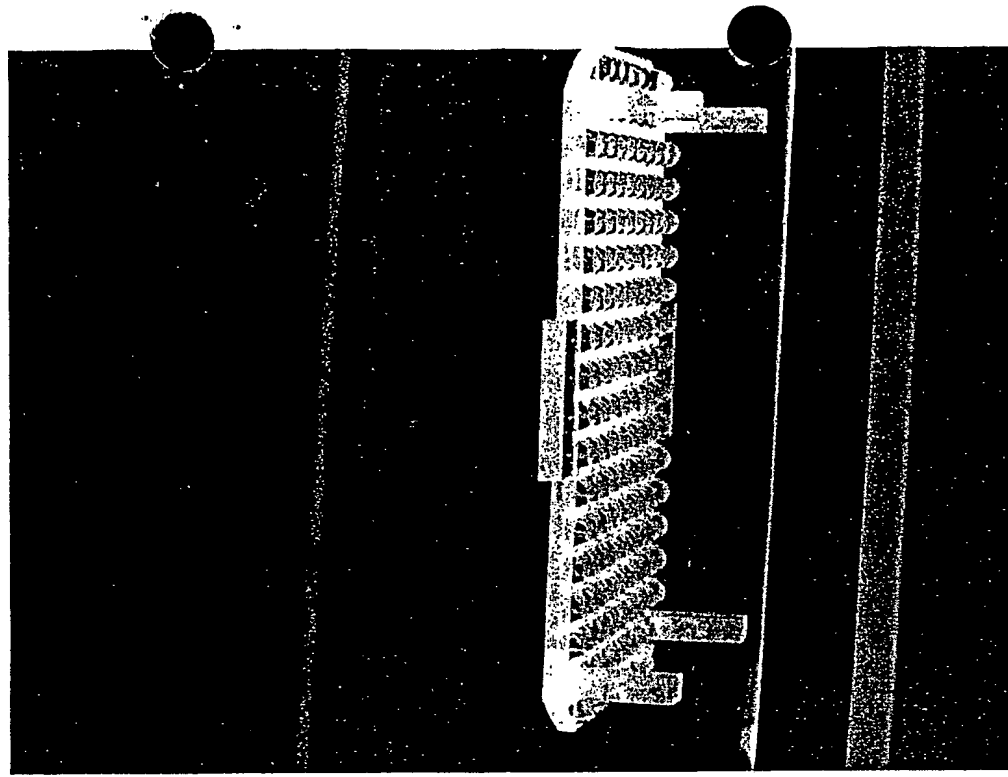


B

Fig. 5



A



B

Fig. 6

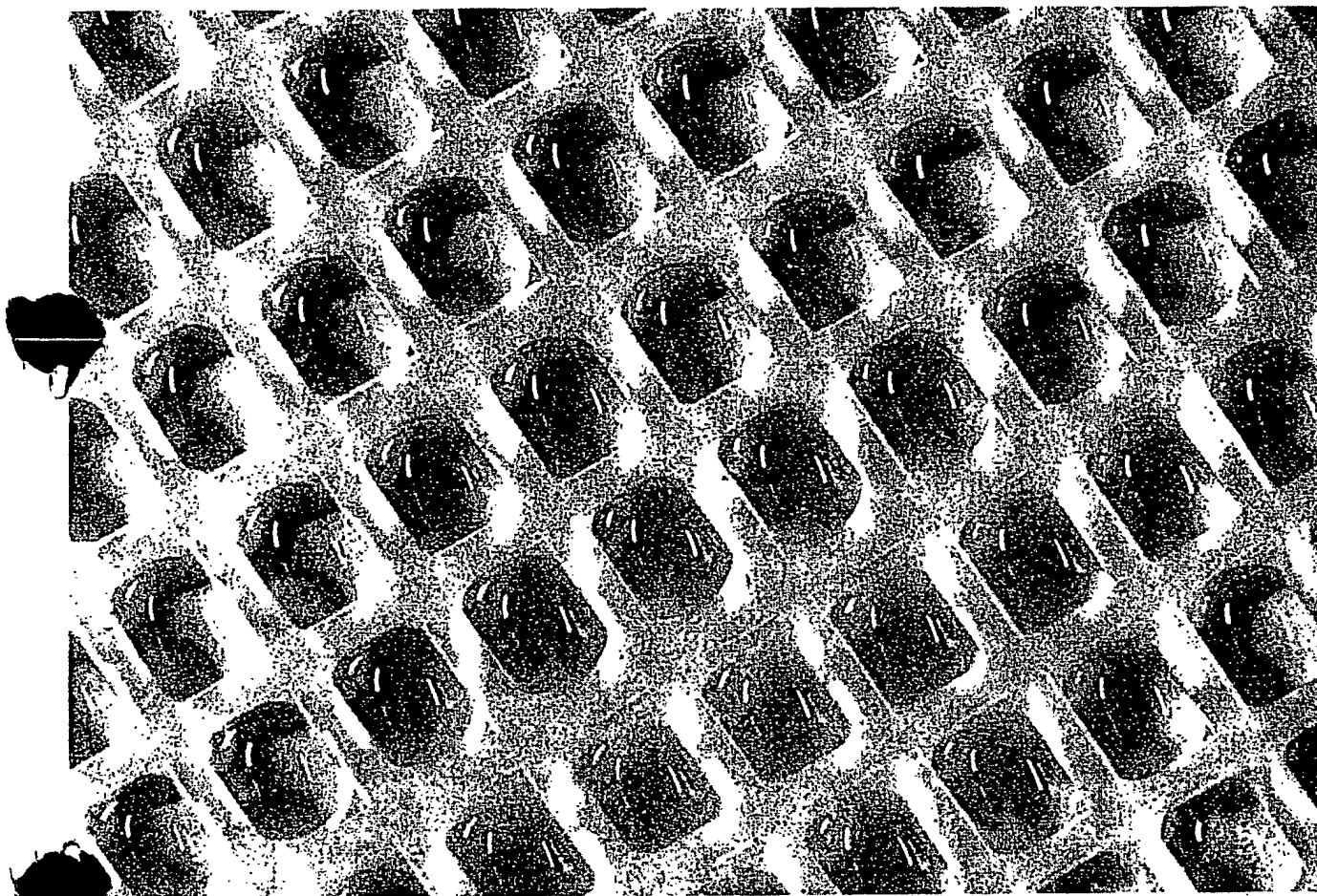
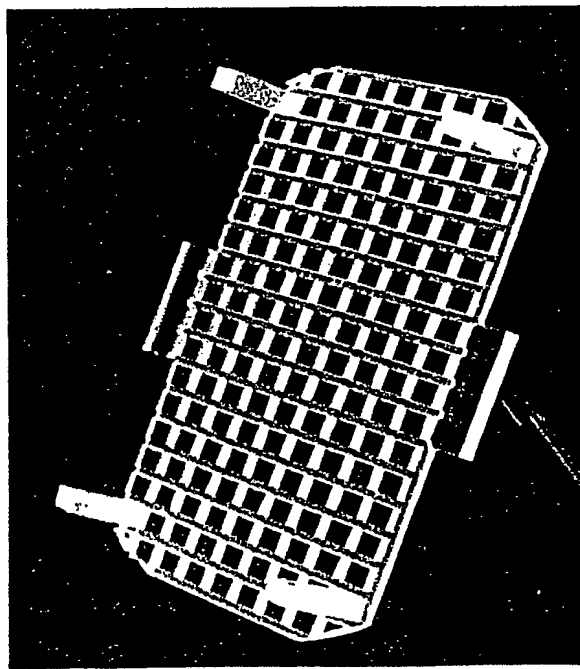
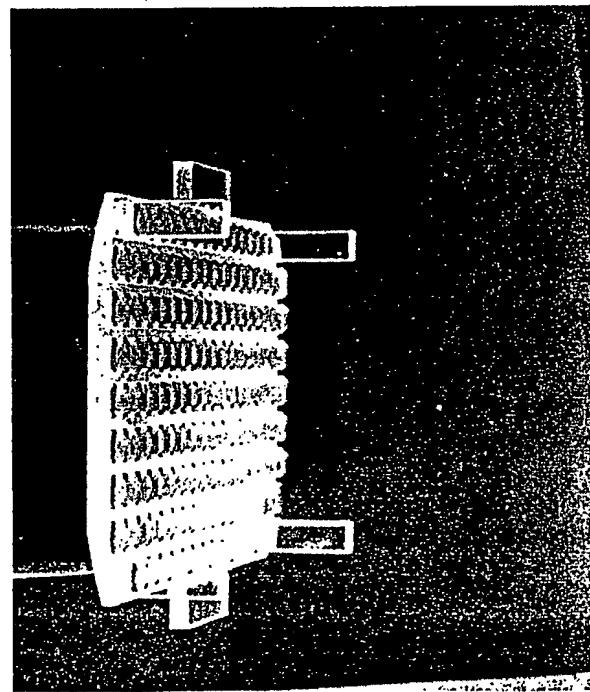


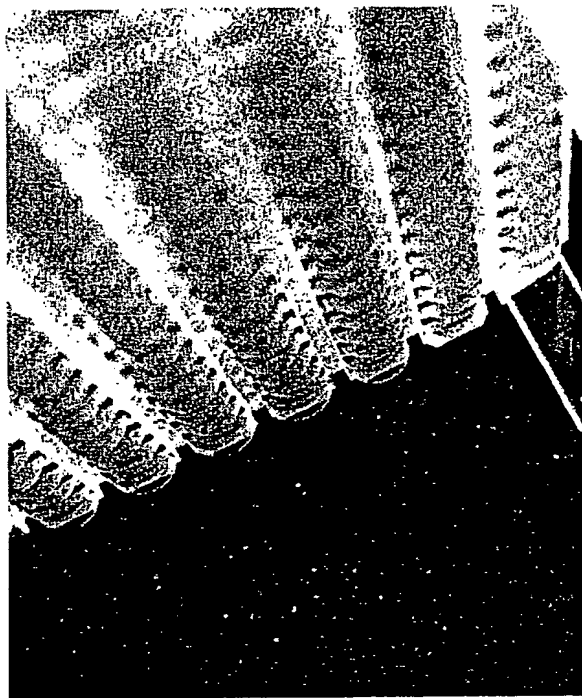
Fig. 7



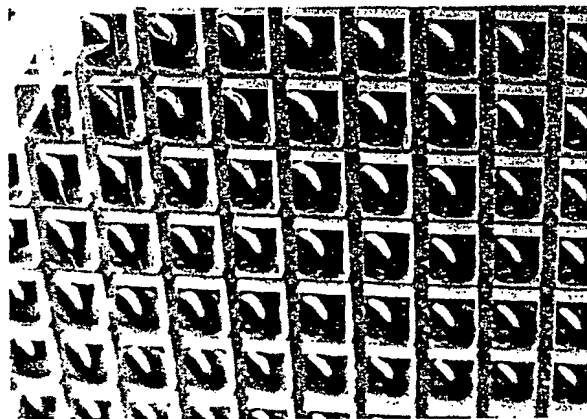
A



B



C



D

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.